



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-146296

(43)公開日 平成5年(1993)6月15日

|                          |       |         |                           |        |
|--------------------------|-------|---------|---------------------------|--------|
| (51)Int.Cl. <sup>5</sup> | 識別記号  | 庁内整理番号  | F I                       | 技術表示箇所 |
| C 1 2 N 15/56            | Z N A | 7823-4B |                           |        |
| 9/38                     |       |         |                           |        |
| 15/70                    |       |         |                           |        |
| // (C 1 2 N 15/56        |       | 8828-4B | C 1 2 N 15/ 00            | A      |
|                          |       |         | 審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 12 頁) | 最終頁に続く |

(21)出願番号 特願平3-335904

(22)出願日 平成3年(1991)11月27日

(71)出願人 000006884

株式会社ヤクルト本社

東京都港区東新橋1丁目1番19号

(72)発明者 飯野 透

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内

(72)発明者 島川 康久

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内

(72)発明者 森下 隆

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内

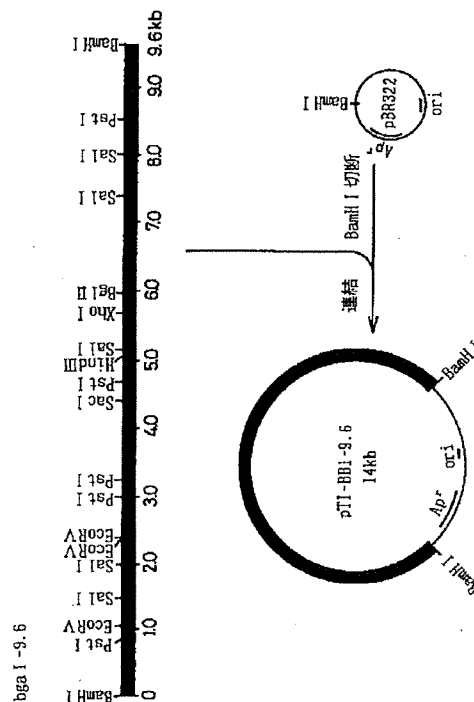
(74)代理人 弁理士 佐藤 正年 (外1名)

(54)【発明の名称】  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を含むDNA断片及び該DNA断片を組み込んだプラスミド

(57)【要約】

【目的】 ビフィドバクテリウム・ブレーベ(以下、B. ブレーベ)由来のガラクトオリゴ糖分解活性を有する $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生遺伝子を含むDNA断片及び該DNA断片を組み込んだプラスミドを得る。

【構成】 乳糖及びガラクトオリゴ糖を加水分解する特徴を有するB. ブレーベ由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生遺伝子を含むDNA断片及び該DNA断片を組み込んだプラスミドであるため、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを大量生産することが可能となり、培養条件が複雑であったビフィドバクテリウムに由来する $\beta$ -ガラクトシダーゼを、本発明により、培養が容易な大腸菌を使用して製造できるようになった。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表1で表されるビフィドバクテリウム・ブレーベ(*Bifidobacterium breve*)由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生遺伝子を含むことを特徴とするDNA断片。

【請求項2】 前記請求項1に記載のDNA断片を組込んだことを特徴とする $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のDNA断片を組込んだプラスミド。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ビフィドバクテリウム・ブレーベ(*Bifidobacterium breve*)由来のガラクトオリゴ糖分解活性を有する $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生遺伝子を含むDNA断片及び該DNA断片を含むプラスミドに関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】近年、組換えDNA実験技術を中心とする遺伝子操作技術は急速に発展してきた。この組換えDNA実験技術を用い、バチルス・ステアロサーモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*)、サーマス・アクアティカス(*Thermus aquaticus*)、ラクトバチルス・ブルガリカス(*Lactobacillus bulgaricus*)等の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子がクローニングされている(特開昭61-81788号、特開昭62-208285号、特開平2-5878号)。

【0003】 $\beta$ -ガラクトシダーゼはラクトースの分解並びにガラクトース転移反応等を行う酵素であるが、手軽に活性を測定できるので、分子生物学では殆ど一般的な手法の一つとなっている。即ち、蛋白質や遺伝子融合の検定を行う上で、反応の進行状況を $\beta$ -ガラクトシダーゼが生合成されるように仕組んだ実験を利用して判断されている。これは、外来性DNA断片を $\beta$ -ガラクトシダーゼの産生に寄与する遺伝子領域に挿入すると $\beta$ -ガラクトシダーゼの産生がなくなることを利用するものであり、培地中に5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド(以下、X-galと記す)を添加しておけば、外来性DNA断片が挿入されていないものは、これを分解して5-ブロモ-4-クロロ-3-インディゴを形成し、菌体を染めて青いコロニーを作るのに対し、外来性DNA断片を挿入した組換え体を持つ菌では、酵素を産生できず、コロニーは無色で容易に選別できるものである。

【0004】ところで、ビフィドバクテリウムは動物の腸管等に在住する細菌で、ヒトの健康にも密接な関係があるとされている。また、発酵乳等の食品にも利用される重要な細菌である。この菌は菌体内に複数種の $\beta$ -ガラクトシダーゼを有しており、この中には乳糖に対し強い加水分解活性を示す酵素分子と、乳糖よりもビフィズス菌増殖因子の一種であるガラクトオリゴ糖をより効率よく加水分解する $\beta$ -ガラクトシダーゼも存在するこ

とが報告されている(馬田三夫 編(1988):ビフィズス菌の化学 56-63頁 株式会社ヤクルト本社発行)。しかしながら、本菌より $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子がクローニングされた例は今までにない。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、鋭意努力の結果、ガラクトオリゴ糖の利用能を持つ細菌であるビフィドバクテリウム・ブレーベ(*Bifidobacterium breve*;以下、B.ブレーベと記す)菌からガラクトオリゴ糖の加水分解活性を持つ新規な $\beta$ -ガラクトシダーゼを産生する遺伝子を取り出し、このDNA断片をベクターDNAに組込んだプラスミドを作成することによって、ガラクトオリゴ糖の加水分解活性のある新規な $\beta$ -ガラクトシダーゼを大量生産することを可能にした。

【0006】本発明は、B.ブレーベ由来のガラクトオリゴ糖分解活性を有する $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生遺伝子を含むDNA断片及び該DNA断片を組込んだプラスミドを得ることを目的とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本請求項1に記載の発明に係る $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を含むDNA断片では、B.ブレーベ由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生遺伝子を含むものである。

【0008】本請求項2に記載の発明に係る $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のDNA断片を組込んだプラスミドでは、前記請求項1に記載のDNA断片を組込んだものである。

## 【0009】

【作用】本発明の $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生遺伝子は、B.ブレーベ由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生遺伝子であり、ガラクトオリゴ糖分解活性を有する $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生遺伝子を含むDNA断片より産生される $\beta$ -ガラクトシダーゼは、乳糖及びガラクトオリゴ糖を加水分解する特徴を有している。このDNA断片を含むプラスミドを作製することで、この特異的性質を有する $\beta$ -ガラクトシダーゼを大量生産することが可能となる。

【0010】B.ブレーベ由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼは、B.ブレーベ由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生遺伝子から産生されるものであればよく、少なくとも $\beta$ -ガラクトシダーゼI及びIIの2種類が得られた。具体的な $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生遺伝子を含むDNA断片は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼIをコードする遺伝子を含んだbgaI-9.6及びこの遺伝子の一部であるbgaI-3.8が得られ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼIIをコードする遺伝子を含んだbgaII-4.9が得られた。尚、 $\beta$ -ガラクトシダーゼIの構造は後述する配列表1に示すアミノ酸配列に含まれる。

【0011】また、B.ブレーベ由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生遺伝子を含むDNA断片を組込んだプラスミドとしては、具体的には $\beta$ -ガラクトシダーゼIをコー

ドするbgaI-9. 6を組み込んだプラスミドpTI-BB1-9. 6及びbgaI-3. 8を組み込んだプラスミドpTI-BB1-3. 8が得られ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼIIをコードするbgaII-4. 9を組み込んだプラスミドpTI-BB2-4. 9が得られた。尚、得られたプラスミドのうち、pTI-BB1-3. 8は、微生物菌第12604号として寄託済み（平成03年11月14日）である。

【0012】本発明におけるオリゴ糖分解活性を持つ $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードするB. プレーベの染色体DNAは、次のようにして分離することができる。先ず、B. プレーベ菌を培養集菌し、N-アセチルムラミダーゼSGとリゾチームとによる処理、SDS処理により溶菌させ、プロテアーゼ処理後、フェノール抽出を繰り返し、エタノール沈殿によりDNAを取り出す。更に、リボヌクレアーゼA処理した後、再びエタノール沈殿により染色体DNAを得る。このようにして得た組換え体プラスミドを、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の欠損した大腸菌に形質転換する。B. プレーベの $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を含むDNA断片の組込まれたプラスミドを保持する大腸菌組換え体は、X-galと形質転換体選択のための薬剤を添加した寒天平板培地で培養した後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼによりX-galが加水分解を受けた結果生じる青色のコロニーを選択することにより得られる。

【0013】次いで、得られた組換え体からのプラスミドの分離は以下の方法で行う。プラスミドを保持する大腸菌を培養後、集菌する。菌体よりアルカリ法やクリアードライゼート法によりプラスミドDNAを得る。得られたプラスミドDNAは、再び大腸菌に形質転換できる。

【0014】上記のようにして得た大腸菌組換え体によって産生された $\beta$ -ガラクトシダーゼが乳糖やガラクトオリゴ糖を加水分解する活性を持つことは、次のようにして確認することができる。

【0015】即ち、組換え体の培養菌体を超音波破碎し、遠心分離により未破碎菌体を除き、粗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素液を得る。これを乳糖溶液並びにガラクトオリゴ糖（TOS-P：株式会社ヤクルト本社製）溶液に加え、37℃で一定時間保温した後、加水分解により遊離したガラクトース分子を定量する。ガラクトースの定量は紫外部吸光度測定法で行うことができる。本方法の原理は遊離ガラクトースにNAD（ニコチン酸アミド アデニン ジヌクレオチド 酸化型）存在下でガラクトース脱水粗酵素を反応させ、生じるNADH（ニコチン酸アミド アデニンジヌクレオチド 還元型）の量を紫外部吸光（340 nm）で計測するものである。これにより乳糖やガラクトオリゴ糖の加水分解の結果生じるガラクトースの量を測定できる。

【0016】本発明による上記 $\beta$ -ガラクトシダーゼ産

生遺伝子を含むDNA断片の塩基配列は、次に示す手順によって決定できる。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を含むDNA断片を、プラスミドベクターpUC119に挿入し、段階的欠失法によって段階的欠失を有する塩基配列決定用のプラスミドを作成する。得られたプラスミドにより大腸菌MV1184を形質転換し、形質転換体を液体培養する。培養途中でヘルパーファージを感染させ、段階的欠失のある1本鎖ファージDNAを得る。本1本鎖DNAを鋳型DNAとして、アプライドバイオシステムズ社のシーケンスキットを使用したダイデオキシ法で塩基配列を決定する。同社の373A型DNAシーケンサーで塩基配列を解読する。

【0017】

【実施例】以下実験例により本発明を具体的に説明する。

#### 実験例1. B. プレーベ YIT4010からの染色体DNAの調製と切断

変法ロゴサ培地（1%乳糖を含む）において16時間培養したB. プレーベ YIT4010菌の培養液80mlより菌体を遠心により集め、20mMリン酸緩衝液（pH6.9）で一度洗った。本菌体を0.8Mショ糖を含むリン酸緩衝液80mlに懸濁した後、リゾチーム（200 $\mu$ g/ml）とN-アセチルムラミデイスSG（20 $\mu$ g/ml・生化学工業）を加え、37℃で20分保温してスフェロプラストを調整した。4,000 $\times$ g、20分の遠心で菌体を集め2mlのリン酸緩衝液に穏やかに懸濁した。12.5mlの0.1M EDTAと0.75mlの1M Tris-HCl（pH7.5）を加えた後、更に25%のSDS溶液1.2ml添加し溶菌させた。

【0018】65℃で1時間加熱処理し、デオキシリボヌクレアーゼを失活させた。これにプロテナーゼK（終濃度200 $\mu$ g/ml：メルク社製）を加えてゆっくりと振盪しながら37℃で3時間保温した。等量のフェノール（TE緩衝液で飽和したもの）を加えて蛋白質の抽出を2度繰り返した後、水層を分取し2倍量のエタノールをこれに重層して、界面に浮遊するDNAをガラス棒で巻き取った。5mlのTE緩衝液に巻き取ったDNAを穏やかに溶解した後、リボヌクレアーゼA（終濃度100 $\mu$ g/ml）を加え、37℃で1時間保温した。再び10mlのエタノールを重層して界面のDNAを集めた。再度TE緩衝液にこれを溶解しエタノールによるDNAの沈殿操作を二度繰り返した。DNAの沈殿を減圧下で乾燥させ、これを少量のTE緩衝液に溶解した。80mlの培養液から約800 $\mu$ gの染色体DNAが得られた。

【0019】B. プレーベ YIT4010の染色体DNA2.5 $\mu$ gに対し、制限酵素BamHIを30ユニット加え37℃で2時間消化した。消化したDNAはフェノール抽出、エーテル抽出、エタノール沈殿、80%エタノール洗浄により精製した。回収したDNAは減圧下で乾燥

した後、水に溶解した。

#### 【0020】実験例2. ベクターDNAの切断及び脱リン酸化

プラスミドpBR322 1.0 $\mu$ gにBamHIを10ユニット加え、37℃で2時間消化した。消化したプラスミドDNAはフェノール抽出、エーテル抽出、エタノール沈殿、80%エタノール洗浄により精製した。回収したDNAは減圧下で乾燥した後、100mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液100 $\mu$ lに溶解し、5ユニットのアルカリホスファターゼを加え37℃で1時間脱リン酸化反応を行った。反応後、フェノール抽出、エーテル抽出、エタノール沈殿、80%エタノール洗浄でDNAを精製した。回収したDNAは減圧下で乾燥した後、水に溶解した。

#### 【0021】実験例3. ベクターDNAへの染色体DNA断片の挿入

上述した実験例1の染色体DNA断片と、実験例2のベクターDNAとを混合し、6.6mM Tris-HCl (pH7.5), 6.6mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM ATP, 5ユニットのT4 DNAリガーゼを加え、16℃で16時間反応させた。

#### 【0022】実験例4. 形質転換と $\beta$ -ガラクトシダーゼを産生する大腸菌組換え体の選択

上述した実験例3の反応液を $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の欠失した大腸菌JM109株に次の方法で形質転換した。ライゲーション反応液をコンピテントセルと混合し、氷水中に、20分間放置した後、42℃に移して2分間保温し、再び氷水中に戻した。これを3mlのLB培地(塩化ナトリウム 0.5%, トリプトン 1%, 酵母エキス 0.5%)に接種し、37℃で1時間振盪培養した。遠心により菌を集めて、40 $\mu$ l/mlの5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド(X-gal)、100 $\mu$ l/mlのアmpiシリンを含むLB寒天プレート上に塗抹し、形質転換株を37℃で生育させ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の発現を示す青色のコロニーを選択した。5000個の形質転換体を得られ、うち $\beta$ -ガラクトシダーゼの産生を示す青色のコロニーを33個得た。

#### 【0023】実験例5. 組換え体プラスミドの精製

上述の実験例4によって選択した33株の $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現クローンを各々アmpiシリン(100 $\mu$ l/ml)を含むLB培地3mlに接種し、16時間培養した。遠心により集菌後、アルカリ法でプラスミドを精製した。即ち、菌体を0.1mlの緩衝液A(25mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM EDTA, 15% ショ糖, 2mg/ml リゾチーム)に懸濁し、0℃で10分間保った。更に0.2mlの緩衝液B(0.2M 水酸ナトリウム, 1% SDS)を加え0℃で10分間保った。3M 酢酸ナトリウムを0.125ml加え、0℃で更に20分間処理した後、25,000

$\times$ gの遠心により沈殿を除き、上清にリボヌクレアーゼA(終濃度50 $\mu$ l/ml)を添加して、37℃で30分間保温した。フェノール抽出、フェノール・クロロホルム(1:1)抽出した後、水層を分取し、2倍量のエタノールを加えて、エタノール沈殿を行った。15,000 $\times$ gの遠心により沈殿を集めた後、これを40 $\mu$ lの水に溶解し、4Mの塩化ナトリウム10 $\mu$ lと13%(W/V)のポリエチレングリコール6000溶液50 $\mu$ lをそれぞれ加えて混合し、0℃で1時間放置した。15,000 $\times$ gで10分間遠心し、DNAを沈殿させた。DNAの沈殿は80%のエタノールで一度洗浄した後、真空下で乾燥させ、少量の水に溶解した。

#### 【0024】実験例6. 組換え体プラスミドの解析

上述した実験例5で得た33株のプラスミドDNAより、それぞれ0.2 $\mu$ g相当を分取し10単位のBamHIを加えて37℃で2時間消化した。消化物を0.7%アガロースゲル上で電気泳動し、臭化エチジウム水溶液(0.5 $\mu$ l/ml)に浸して染色した後、紫外線ランプ照射下で写真撮影した。33株のうち10株のプラスミドにおいて9.6kbの挿入DNA断片が共通して認められた。また、残りの23株のプラスミドからは4.9kbの挿入DNA断片が共通して認められた。

【0025】9.6kb並びに4.9kbの挿入DNA断片を挿入したプラスミドにより、再び大腸菌JM109株を形質転換すると、何れも $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を発現した。このことよりクローニングした9.6kbのDNA断片並びに4.9kbのDNA断片が、何れも $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードしていることが確認できた。

【0026】得られた9.6kbのDNA断片をbgaI-9.6とし、これにコードされる $\beta$ -ガラクトシダーゼを $\beta$ -ガラクトシダーゼIと命名した。本DNA断片をpBR322に挿入したプラスミドをpTI-BB1-9.6と命名した。一方、4.9kbのDNA断片をbgaII-4.9とし、これにコードされる $\beta$ -ガラクトシダーゼを $\beta$ -ガラクトシダーゼIIと命名した。本DNA断片をpBR322に挿入したプラスミドをpTI-BB2-4.9と命名した。9.6kb並びに4.9kbの挿入DNA断片についてSalI, PstI, EcoRI, EcoRV, XhoI, BglII, HindIII等で消化して制限酵素切断地図を作成した。

【0027】図1はプラスミドpTI-BB1-9.6の構築を示す説明図であり、図に示すように9.6kbの挿入DNA断片(bgaI-9.6)とプラスミドpBR322とを連結してプラスミドpTI-BB1-9.6を得ることを示している。また、図2はプラスミドpTI-BB2-4.9の構築を示す説明図であり、図に示すように4.9kbの挿入DNA断片(bgaII-4.9)とプラスミドpBR322とを連結してプラスミドpTI-BB2-4.9を得ることを示してい

る。図1及び図2のDNA断片に示す通り、bgaI-9.6とbgaII-4.9との制限酵素切断地図について共通点はなく、両DNA断片は異なる $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子であることが確認できた。

#### 【0028】実験例7. $\beta$ -ガラクトシダーゼ粗酵素の調製

$\beta$ -ガラクトシダーゼIを産生する大腸菌組換え体JM109(pTI-BB1-9.6)並びに $\beta$ -ガラクトシダーゼIIを産生する大腸菌組換え体JM109(pTI-BB2-4.9)をアンピシリンを含むLB培地10mlに接種し、37℃で16時間振盪培養した。6,000×g, 10分間の遠心により集菌後、菌体を1mlのリン酸緩衝液(20mM, pH6.8)に懸濁し、5分間超音波破碎機にかけ破碎した。超遠心(40000×g, 30分間)で破碎残渣を除き、上清を各 $\beta$ -ガラクトシダーゼの粗酵素標品とした。粗酵素の蛋白質濃度はバイオラッド プロテインアッセイキット(Bio-Rad社)により測定した。

#### 【0029】実験例8. $\beta$ -ガラクトシダーゼI、IIの至適pHの測定

上述の実験例7で得た粗酵素標品を用い、 $\beta$ -ガラクトシダーゼI並びに $\beta$ -ガラクトシダーゼIIの至適pHの測定をリン酸緩衝液(pH5.29-pH8.09)及びMcIlvaine緩衝液(pH3.0-pH7.0)を使用して行った。活性測定はO-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトシド(ONPG)を用いる方法(エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Experiments in Molecular Genetics), J.H. Miller p403 (1972))に従って行った。

【0030】 $\beta$ -ガラクトシダーゼIの至適pHは5.6、 $\beta$ -ガラクトシダーゼIIの至適pHは6.3であっ

た。37℃において1分間に1nmolのニトロフェノールを遊離する活性強度を1ユニットとすると、至適pHのリン酸緩衝液中で、 $\beta$ -ガラクトシダーゼI粗酵素は1 $\mu$ g蛋白質当たり、1.36ユニット、 $\beta$ -ガラクトシダーゼII粗酵素は1 $\mu$ g蛋白質当たり0.361ユニットの活性強度を示した。尚、ベクターpBR322のみで形質転換した大腸菌組換え体では活性は $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は全く検出されなかった。

#### 【0031】実験例9. $\beta$ -ガラクトシダーゼI、IIによる乳糖、ガラクトオリゴ糖の分解

同様に実験例7で得た $\beta$ -ガラクトシダーゼI、II並びに市販の大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いて乳糖とガラクトオリゴ糖に対する加水分解活性を比較した。5%(W/V)濃度の乳糖及びガラクトオリゴ糖(TOSP: 株式会社ヤクルト本社)を至適pHの100mMリン酸緩衝液に溶解したものに2ユニットの $\beta$ -ガラクトシダーゼを加えた後、蒸留水を加えて100 $\mu$ gとした。市販の大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼ(東洋紡株式会社)はZ buffer (エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Experiments in Molecular Genetics), J.H. Miller p403 (1972))を使用し、それぞれ37℃で1時間保温した後、3分間煮沸して酵素を失活させた。各 $\beta$ -ガラクトシダーゼにより加水分解された結果、生じた遊離ガラクトース分子を紫外部吸光度測定法(Fキット; ベーリンガー・マンハイム山之内株式会社)で測定した。乳糖溶液と各 $\beta$ -ガラクトシダーゼを作用させた時に遊離されるガラクトースの量を100として、ガラクトオリゴ糖を基質とした場合に生じる遊離ガラクトース量を相対値で次の表1に示した。

#### 【0032】

【表1】

| 使用した $\beta$ -ガラクトシダーゼ | 加水分解により生じたガラクトース量の相対値 |                   |
|------------------------|-----------------------|-------------------|
|                        | 乳糖(5%(W/V))           | ガラクトオリゴ糖(5%(W/V)) |
| 大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼ  | 100                   | 11                |
| JM109(pTI-BB2-4.9)     | 100                   | 8                 |
| JM109(pTI-BB1-9.6)     | 100                   | 630               |
| JM109(pTI-BB1-3.8)     | 100                   | 700               |

【0033】 $\beta$ -ガラクトシダーゼIIは市販の大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼと同様にガラクトオリゴ糖の加水分解活性の相対値は低かったが、 $\beta$ -ガラクトシダーゼIは乳糖を基質にした時に比べガラクトオリゴ糖を基質としたときに約6倍のガラクトースを遊離したことから、ガラクトオリゴ糖に対する加水分解活性が高いことが確認された。

#### 【0034】実験例10. $\beta$ -ガラクトシダーゼI遺伝子領域の同定

図1に示した $\beta$ -ガラクトシダーゼI遺伝子断片bgaI-9.6を種々の制限酵素で切断して、欠失体を作成した。欠失DNA断片をプラスミドベクターpKK23-3に挿入し、これらのプラスミドを用いて大腸菌JM108を形質転換した。各組換え体をX-galを含

むLB寒天平板培地上に塗抹し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性をコードするDNA断片を調べた。その結果、図3に示した3.8kbのPstI DNA断片があれば $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の発現には充分であった。

【0035】本3.8kb断片はpKK223-3のPstIサイトへの挿入方向の違いにより、X-galを含むLB寒天平板上での青色の発色の強度に差が認められた。そこでpKK223-3への3.8kb DNA断片の挿入方向の違うプラスミドをそれぞれ大腸菌JM109に形質転換し、これらをLB液体培地に接種、培養し、ベクター上のtacプロモーターの誘導により $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が上昇するか否かを調べた。即ち、対数増殖期まで37℃で振盪培養した菌体培養液を2等分し、一方にはIPTG(0.02mM)を添加し、もう一方は添加せず、それぞれ更に3時間振盪培養を続けた。

【0036】培養液中の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性をONPGを基質にして調べると、ベクター上のtacプロモーターに対して一定方向に3.8kbのDNA断片を挿入したプラスミドを保持する組換え体でのみIPTG添加による $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の上昇が認められた。即ち、ベクター上のtacプロモーターに対し $\beta$ -ガラクトシダーゼI遺伝子が順方向にクローニングされたプラスミドであることが確認でき、本プラスミドをpTI-BB1-3.8と命名した。図3はプラスミドpTI-BB1-3.8の構築を示した説明図である。

【0037】本プラスミドを導入した $\beta$ -ガラクトシダーゼIを誘導生産する大腸菌組換え体JM109(pTI-BB1-3.8)の培養菌体について、実験例9と同様の方法で乳糖とガラクトオリゴ糖の加水分解活性を調べたところ、乳糖の分解活性を100とした場合にガラクトオリゴ糖分解活性は700を示し、DNA断片bgaI-9.6を有するJM109(pTI-BB1-9.6)を用いた場合とほぼ同じであった。以上のように、3.8kbの領域があれば、9.6kbのDNA断片より産生される $\beta$ -ガラクトシダーゼと同質の酵素が産生されることが確認でき、本領域内に $\beta$ -ガラクトシダーゼIの構造遺伝子が存在することが確認できた。

【0038】実験例11.  $\beta$ -ガラクトシダーゼIの分子量の測定

JM109(pKK223-3)及びJM109(pTI-BB1-3.8)を100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLB培地3mlに接種し、37℃で2時間培養後、IPTG(0.02mM)を添加し、更に3時間振盪培養した。培養液0.2mlを分取し、6,000 $\times$ g、10分間の遠心により菌体を集め、2%のラウリル硫酸ナトリウム溶液に懸濁し、95℃、3分間の加熱処理で可溶化した菌体蛋白質を5%のアクリルアミドゲルで電気泳動した。電気泳動はレムリの方法(Laemmli, U.K., Nature 227:680, 1970)に準じて行った。 $\beta$ -ガラクトシダ

ーゼIを発現しない対照として用いたJM109(pKK223-3)の蛋白質のバンド以外に、JM109(pTI-BB1-3.8)では分子量約75000ダルトンに相当する蛋白質のバンドが検出された。本蛋白質が $\beta$ -ガラクトシダーゼIであると推測された。

【0039】実験例12.  $\beta$ -ガラクトシダーゼI遺伝子の塩基配列の決定

実験例10のプラスミドpTI-BB1-3.8の0.2 $\mu$ gに対し、10単位のPstIで2時間消化し、1%のアガロースゲルで電気泳動した。ゲルを臭化エチウムに浸して染色後、紫外線ランプ照射下で $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む3.8kbのDNA断片を含むゲル部分を切り取り、ゲル片よりジーンクリーン(BIO 101 Inc, California, USA)を使用してDNAを精製した。本DNA断片をプラスミドベクターpUC119のPstIサイトにDNAリガーゼを用いて連結した。

【0040】本プラスミドを大腸菌MV1184に形質転換し、増幅、精製後、段階的欠失法により $\beta$ -ガラクトシダーゼI遺伝子の部分欠失プラスミドを多種類作製した。本操作にはキョシークエンス用デレクションキット(宝酒造株式会社)を用いた。段階的欠失のある一本鎖DNAを鋳型にしてアプライドバイオシステムズ社のジデオキシプライマー サイクル シークエンス キットを使用してジデオキシ法で $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む3.8kbのDNA断片の塩基配列を決定した。塩基配列の解析は同社の373型DNAシークエンサーで行った。

【0041】実験例10で明らかとなった遺伝子の方向性、及び実験例11で推測された分子量を加味し、決定した塩基配列より $\beta$ -ガラクトシダーゼIをコードする領域及びそのアミノ酸配列を推定し、後述する配列表1に示した。アミノ酸配列の推定にはGENETYX遺伝情報処理ソフトウェア(SDCソフトウェア開発株式会社)を使用した。

【0042】

【発明の効果】本発明は以上説明したとおり、乳糖及びガラクトオリゴ糖を加水分解する特徴を有するB. プレーベ由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ生産遺伝子を含むDNA断片であり、該DNA断片を組込んだプラスミドであるため、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを大量生産することが可能となり、培養条件が複雑であったビフィドバクテリウムに由来する $\beta$ -ガラクトシダーゼを、本発明により、培養が容易な大腸菌を使用して製造できるようになった。

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：3870

配列の型：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名 : (Bifidobacterium brev  
e)  
株名 : YIT4010  
配列の特徴  
特徴を表す記号 : -30 signal  
存在位置 : 174..179  
特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : -10 signal  
存在位置 : 198..203  
特徴を決定した方法 : S  
特徴を表す記号 : RBS  
存在位置 : 212..217  
特徴を決定した方法 : S

## 配列

```

GCAGAAGTAC TGGCAGTCCG GCCTCGCCGC AGGCGCCGTC AAGGAGTAAC CGTACTTCGG      60
CTCCCTTCTG GTGGAGGGAG CCGAGATAAA GGCATAACCA CTAACAGGAA GGAGGCGCCT      120
ATGCAGATAT TCGCATTGTT GAGAATCGTG CAGGCGCCTC CTTGCGTATC TGCCTGACTC      180
CCATTTGCCC ACACGTAGAT ATTTATTCAT TAAAGGAACA GCATCATC  ATG GAA CAT      237
                                     Met Glu His
                                     1
CGC GAA TTC AAG TGG CCG CAG CCT CTT GCG GGT GGC AAG CCC CGC ATC      285
Arg Glu Phe Lys Trp Pro Gln Pro Leu Ala Gly Gly Lys Pro Arg Ile
      5              10              15
TGG TAC GGC GGC GAC TAC AAC CCC GAC CAG TGG CCG GAG GAA GTC TGG      333
Trp Tyr Gly Gly Asp Tyr Asn Pro Asp Gln Trp Pro Glu Glu Val Trp
      20              25              30              35
GAC GAA GAT GTA GCC CTC ATG CAG AAG GCC GGC GTC AAC CTC GTC TCC      381
Asp Glu Asp Val Ala Leu Met Gln Lys Ala Gly Val Asn Leu Val Ser
              40              45              50
GTA GCC ATC TTC TCT TGG GCC AAG CTT GAG CCC GAA GAA GGT GTG TAT      429
Val Ala Ile Phe Ser Trp Ala Lys Leu Glu Pro Glu Glu Gly Val Tyr
              55              60              65
GAC TTC GAT TGG CTC GAC CGC GTC ATC GAC AAG CTC GGC AAG GCC GGC      477
Asp Phe Asp Trp Leu Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Gly Lys Ala Gly
              70              75              80
ATC GCC GTC GAT CTC GCC TCC GGC ACC GCA TCC CCG CCG ATG TGG ATG      525
Ile Ala Val Asp Leu Ala Ser Gly Thr Ala Ser Pro Pro Met Trp Met
              85              90              95
ACC CAG GCC CAC CCG GAG ATC CTC TGG GTC GAC TAC CGC GGC GAC GTC      573
Thr Gln Ala His Pro Glu Ile Leu Trp Val Asp Tyr Arg Gly Asp Val
      100              105              110              115
TGC CAG CCC GGT GTC CGA CAG CAC TGG CGG GCC ACC AGC CCG GTC TTC      621
Cys Gln Pro Gly Val Arg Gln His Trp Arg Ala Thr Ser Pro Val Phe
              120              125              130
CTT GAC TAC GCG CTC AAC CTG TGC CGC AAG ATG GCC GAA CAC TAC AAG      669
Leu Asp Tyr Ala Leu Asn Leu Cys Arg Lys Met Ala Glu His Tyr Lys
              135              140              145
GAC AAC CCC TAT GTG GTC TCT TGG CAC GTG AGC AAC GAG TAC GGC TGC      717
Asp Asn Pro Tyr Val Val Ser Trp His Val Ser Asn Glu Tyr Gly Cys
              150              155              160
CAC AAC CGC TTC GAC TAC TCC GAA GAT GCT GAG CGC GCC TTC CAG AAG      765
His Asn Arg Phe Asp Tyr Ser Glu Asp Ala Glu Arg Ala Phe Gln Lys
              165              170              175
TGG TGC GAG AAG AAG TAC GGC ACC ATC GAC GCC GTC AAT GAC GCC TGG      813
Trp Cys Glu Lys Lys Tyr Gly Thr Ile Asp Ala Val Asn Asp Ala Trp
      180              185              190              195

```



|   |      |
|---|------|
| GGC ACC GCC TTC TGG GCG CAG CGC ATG AAC AAC TTC TCC GAG ATC ATC | 861  |
| Gly Thr Ala Phe Trp Ala Gln Arg Met Asn Asn Phe Ser Glu Ile Ile |      |
| 200 205 210   |      |
| CCG CCG CGC TTC ATC GGC GAT GGC AAC TTC ATG AAC CCG GGC AAA CTG | 909  |
| Pro Pro Arg Phe Ile Gly Asp Gly Asn Phe Met Asn Pro Gly Lys Leu |      |
| 215 220 225   |      |
| CTT GAC TGG AAG CGC TTC AGC TCC GAC GCC CTG CTC GAC TTT TAC AAG | 957  |
| Leu Asp Trp Lys Arg Phe Ser Ser Asp Ala Leu Leu Asp Phe Tyr Lys |      |
| 230 235 240   |      |
| GCC GAG CGC GAC GTC CTG CTC GAG ATC GCC CCC AAG CCG CAG ACC ACC | 1005 |
| Ala Glu Arg Asp Val Leu Leu Glu Ile Ala Pro Lys Pro Gln Thr Thr |      |
| 245 250 255   |      |
| AAC TTC ATG GTC TCC GCC GGC GGT GCC GGC ATC GAT TAC GAC AAG TGG | 1053 |
| Asn Phe Met Val Ser Ala Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Trp |      |
| 260 265 270 275   |      |
| GGT TAC GAC GTG GAC TTC GTG TCC AAC GAT CAC TAC TTC ACT CCT GGC | 1101 |
| Gly Tyr Asp Val Asp Phe Val Ser Asn Asp His Tyr Phe Thr Pro Gly |      |
| 280 285 290   |      |
| GAA GCT CAC TTC GAC GAA CTG GCT TAC TCG GCC TCC CTG TGC GAC GGC | 1149 |
| Glu Ala His Phe Asp Glu Leu Ala Tyr Ser Ala Ser Leu Cys Asp Gly |      |
| 295 300 305   |      |
| ATC GCC CGC AAG AAT CCG TGG TTC CTC ATG GAG CAC TCC AGC TCC GCC | 1197 |
| Ile Ala Arg Lys Asn Pro Trp Phe Leu Met Glu His Ser Ser Ser Ala |      |
| 310 315 320   |      |
| GTC AAT TGG CGT CCG ATC AAC TAC CGC GTC GAA CCC GGC GAA CTG GTG | 1245 |
| Val Asn Trp Arg Pro Ile Asn Tyr Arg Val Glu Pro Gly Glu Leu Val |      |
| 325 330 335   |      |
| CGT GAC TCC CTG GCC CAC CTG GCC ATG GGC TCC GAC GCC ATC TGC TAC | 1293 |
| Arg Asp Ser Leu Ala His Leu Ala Met Gly Ser Asp Ala Ile Cys Tyr |      |
| 340 345 350 355   |      |
| TTC CAG TGG CGC CAG TCC AAG GCC GGT GCC GAG AAG TGG CAC TCC TCG | 1341 |
| Phe Gln Trp Arg Gln Ser Lys Ala Gly Ala Glu Lys Trp His Ser Ser |      |
| 360 365 370   |      |
| ATG GTT CCT CAC GCG GGC CCC GAC TCC CAG ATC TTC CGC GAC GTG TGC | 1389 |
| Met Val Pro His Ala Gly Pro Asp Ser Gln Ile Phe Arg Asp Val Cys |      |
| 375 380 385   |      |
| GAG CTG GGT GCC GAC CTC AAC AAA CTT GCT GAC GAG GGC CTG CTG AGC | 1437 |
| Glu Leu Gly Ala Asp Leu Asn Lys Leu Ala Asp Glu Gly Leu Leu Ser |      |
| 390 395 400   |      |
| ACC AAG CTG GTC AAG TCC AAG GTC GCC GTC GTC TTC GAT TAC GAG TCC | 1485 |
| Thr Lys Leu Val Lys Ser Lys Val Ala Val Val Phe Asp Tyr Glu Ser |      |
| 405 410 415   |      |
| CAG TGG GCT ACG GAA CAC ACC GCC ACG CCT ACT CAG GAG GTA CGC CAT | 1533 |
| Gln Trp Ala Thr Glu His Thr Ala Thr Pro Thr Gln Glu Val Arg His |      |
| 420 425 430 435   |      |
| TGG ACC GAG CCG CTC GCG TGG TTC CGC GCG CTG GCG GAC AAC GGT CTG | 1581 |
| Trp Thr Glu Pro Leu Ala Trp Phe Arg Ala Leu Ala Asp Asn Gly Leu |      |
| 440 445 450   |      |
| ACC GCA GAC GTG GTG CCG GTT CGC GGC CCC TGG GAC GAG TAC GAA GCC | 1629 |
| Thr Ala Asp Val Val Pro Val Arg Gly Pro Trp Asp Glu Tyr Glu Ala |      |

|  |     |     |      |
|--|-----|-----|------|
| 455  | 460 | 465 |      |
| GTC GTG CTG CCG AGC CTG ACC ATC CTG TCT GAA GAG ACC ACG CGC CGC    |     |     | 1677 |
| Val Val Leu Pro Ser Leu Thr Ile Leu Ser Glu Glu Thr Thr Arg Arg    |     |     |      |
| 470  | 475 | 480 |      |
| GTG CGC GAG TAT GTG GCG AAC GGC GGC AAG CTG TTC GTG ACC TAC TAC    |     |     | 1725 |
| Val Arg Glu Tyr Val Ala Asn Gly Gly Lys Leu Phe Val Thr Tyr Tyr    |     |     |      |
| 485  | 490 | 495 |      |
| ACC GGT CTG GTG GAC GAC AAG GAT CAC GTC TGG CTG GGT GGC TAC CCC    |     |     | 1773 |
| Thr Gly Leu Val Asp Asp Lys Asp His Val Trp Leu Gly Gly Tyr Pro    |     |     |      |
| 500  | 505 | 510 | 515  |
| GGC TCC ATC CGT GAC GTG GTG GGC GTG CGC GTT GAG GAA TTC GCC CCG    |     |     | 1821 |
| Gly Ser Ile Arg Asp Val Val Gly Val Arg Val Glu Glu Phe Ala Pro    |     |     |      |
| 520  | 525 | 530 |      |
| ATG GGC AAC GAC TTC CCC GGT GCC ATG GAC CAC CTC GAC TTG GAC AAC    |     |     | 1869 |
| Met Gly Asn Asp Phe Pro Gly Ala Met Asp His Leu Asp Leu Asp Asn    |     |     |      |
| 535  | 540 | 545 |      |
| GGG ACC GTG GCG CAC GAT TTC GCC GAC GTG ATC ACC TCC GTG GCC GAT    |     |     | 1917 |
| Gly Thr Val Ala His Asp Phe Ala Asp Val Ile Thr Ser Val Ala Asp    |     |     |      |
| 550  | 555 | 560 |      |
| ACC GCT CAC GTG GTT GCT TCC TTC AAG GCT GAT AAG TGG ACC GGT TTC    |     |     | 1965 |
| Thr Ala His Val Val Ala Ser Phe Lys Ala Asp Lys Trp Thr Gly Phe    |     |     |      |
| 565  | 570 | 575 |      |
| GAC GGC GCT CCC GCC ATC ACC GTC AAC GAC TTT GGC GAC GGC AAG GCC    |     |     | 2013 |
| Asp Gly Ala Pro Ala Ile Thr Val Asn Asp Phe Gly Asp Gly Lys Ala    |     |     |      |
| 580  | 585 | 590 | 595  |
| GCA TAC GTC GGT GCC CGT CTC GGC CGT GAG GGC TTG GCC AAG AGC CTG    |     |     | 2061 |
| Ala Tyr Val Gly Ala Arg Leu Gly Arg Glu Gly Leu Ala Lys Ser Leu    |     |     |      |
| 600  | 605 | 610 |      |
| CCC GCG CTG CTG GAG GAA CTC GGC ATC GAG ACC TCG GCC GAA GAC GAT    |     |     | 2109 |
| Pro Ala Leu Leu Glu Glu Leu Gly Ile Glu Thr Ser Ala Glu Asp Asp    |     |     |      |
| 615  | 620 | 625 |      |
| CGC GGC GAA GTG CTG CGC GTC GAG CGT GCG GAT GAG AGC GGC GAG AAC    |     |     | 2157 |
| Arg Gly Glu Val Leu Arg Val Glu Arg Ala Asp Glu Ser Gly Glu Asn    |     |     |      |
| 630  | 635 | 640 |      |
| CAC TTC GTG TTC CTG TTC AAC CGC ACC CAC GAT GTG GCG ATT GTG GAC    |     |     | 2205 |
| His Phe Val Phe Leu Phe Asn Arg Thr His Asp Val Ala Ile Val Asp    |     |     |      |
| 645  | 650 | 655 |      |
| GTG GAC GGC GAG CCG CTG GTC GCC TCG CTG GCT CAG GTC AAC GAA TCC    |     |     | 2253 |
| Val Asp Gly Glu Pro Leu Val Ala Ser Leu Ala Gln Val Asn Glu Ser    |     |     |      |
| 660  | 665 | 670 | 675  |
| GAG CAT ACG GCG GCC ATC CAG CCG AAC GGT GTG CTG GTG GTA AAG CTG    |     |     | 2301 |
| Glu His Thr Ala Ala Ile Gln Pro Asn Gly Val Leu Val Val Lys Leu    |     |     |      |
| 680  | 685 | 690 |      |
| TAAAGAGGTC TATTGTAGC GATTCAAATG CGATGGCGGG CGTGTTAGCG ATAACACGCC   |     |     | 2361 |
| CGCCATCGCA TTGCGATTT GTTTGAGAT GTGTATACTA AAAGATGTTA TCGCAACCAT    |     |     | 2421 |
| AGCGAAAGGA ATGGCTTCAT AAAGCCACTT CTCAATGTCTG AGGAGAAATC AATAATTGAC |     |     | 2481 |
| ACTCGGCGAC ACGCAATGAT TGCGAGCGAC AAAACAGTTT GAATCGTTTT GGACGATTCG  |     |     | 2541 |
| AGGAAGGAGA ACAGAACGAT GAAGTTCACT ACCGCCAAGA AGGCCGTTGC CCTCACGGT   |     |     | 2601 |
| GCGGTTGCCA TGCTGGTTTC CGTTGCCGCC TGCGGCTCTG ATAGCGGCAA GTCCAGCCAG  |     |     | 2661 |
| CCGGCTCAGG ATTCGACGT CAAGGAAATC ACCGTCTGGG CTTGGGAGCC TTCGCTGACC   |     |     | 2721 |

```

CAGGTTGCCA AGGACTTCGA GAAGGAGACC GGCATCAAGG TCGACCTGAA GAACGTCGGT 2781
ACCAACACCA AGGAATACAC TCAGCTGGAC AACGCCATTG AGGCTGGCTC TGGCGCTCCG 2841
GACGTCGCTC AGGTTGAGTA CTACGCCGTC CCGCAGTACG CCATCAAGGG CAACCTGCTG 2901
GACATCACCG ACAAGACCTC TGGTTACAAG GATTTCTACA CCCCTGGCCC GTGGGCTTCC 2961
GTGCAGTTCG CCGGCAAGGT CTACGGTCTG CCGATGGATT CCGGCCCAAT GGCCTTCTTC 3021
TACAACAAGG AAGTCTTCGA CAAGGCCGGC GTTGATGCCG AGCAGATCAA GACCTGGGAT 3081
CAGTACTACG ACGCCGCCAA GAAGATTCAC GCCCTCGCG ACAAATACTA CATCACCTCC 3141
GACACCGGCG ACGCCGGCTT CTTGCACTCC ATGACCTGGC TGGCCGGCGC CAAGCCGTTT 3201
CAGACCTCCT CCGATGGTTC CGAAGTCACC GTCAACCTGA CCGAAGACAA GGGCGTCAAG 3261
ACCTTCACCG ACTTCTGGCA GAAGCTGCTG GACGAGGTC TGCTCGACAC CAAGACGCC 3321
GGCTGGTCCG AGGATTGGTT CAAGGGCATG GTCGACGGCA CCATCGCCTC CCTGTTCACT 3381
GGCGCTTGA TGCCTGCCAA CCTTGCTAAC TCCGCTGCTG ACGGTGCCGG CAAGTGGCGT 3441
GTGGCCAGA TGCCGACCGC TGACGGCTCC ACCACCAACT CTGAGAACGG TGGTTCTTCG 3501
CTGGCTGTGC TCGCCTCCAC CAAGAAGGCT GATGCTGCTT ACCAGTTCAT CGAGTACGCC 3561
AACCATGGTG CTGGTGTGGC CACTCGTGTG GCTGGCGCG CCTTCCCGC TGACAAGGCC 3621
TCCCTGAAA AGGACTCCTT CAAGAAGGCC ACCACCGTGA AGAACGCCGA TGGTCAGGAT 3681
GTTGACTACT TCGGTGGTCA GAAGTACAAC GAGGTCTCG CTCAGGCTGC TGAGAACTG 3741
TCCTCCGGCT ACCAGTTCCT GCCCTTCGAG GTCAAGGCC GCACCATCTT CGGCGACTAC 3801
TTTGGCAAGT CCTACACCGG TGACCAGAAG CTGAGCGACG GTGTCGCTGC TTGGCAAAAG 3861
GCCCTGCAG 3870

```

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpTI-BB1-9.6の構築を示す説明図である。

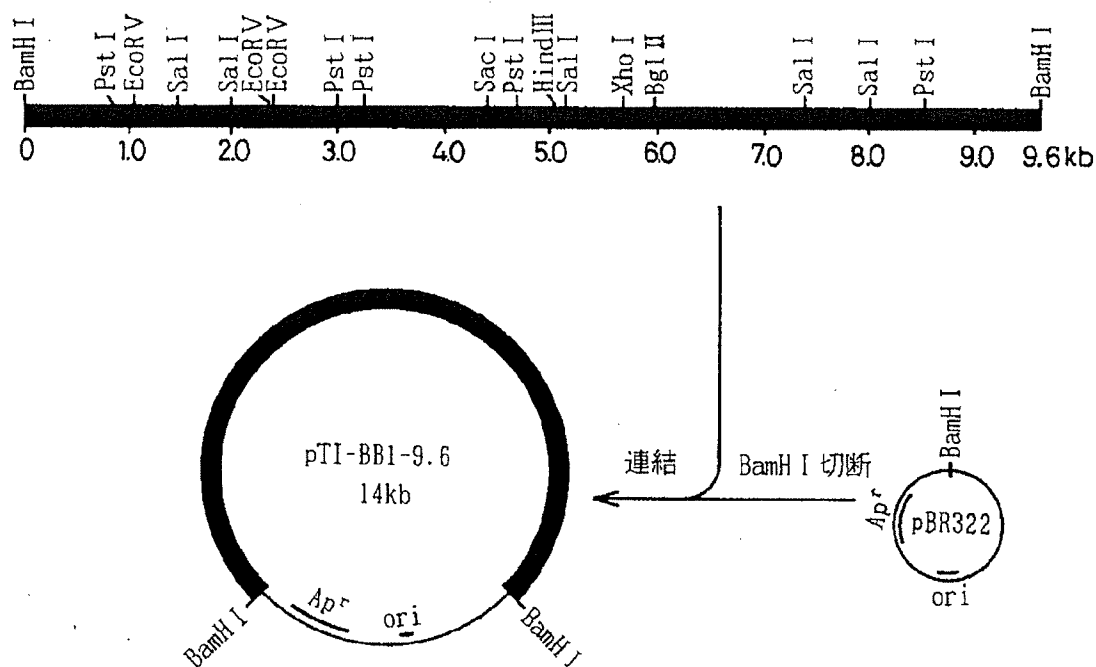
【図2】プラスミドpTI-BB2-4.9の構築を示す説明図である。

【図3】プラスミドpTI-BB1-3.8の構築を示す説明図である。

【図3】プラスミドpTI-BB1-3.8の構築を示す説明図である。

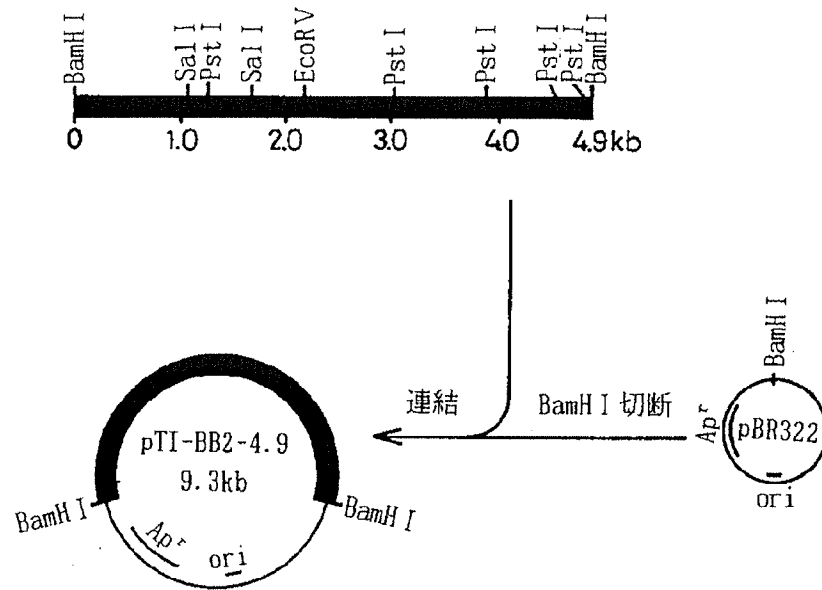
【図1】

bga I -9.6

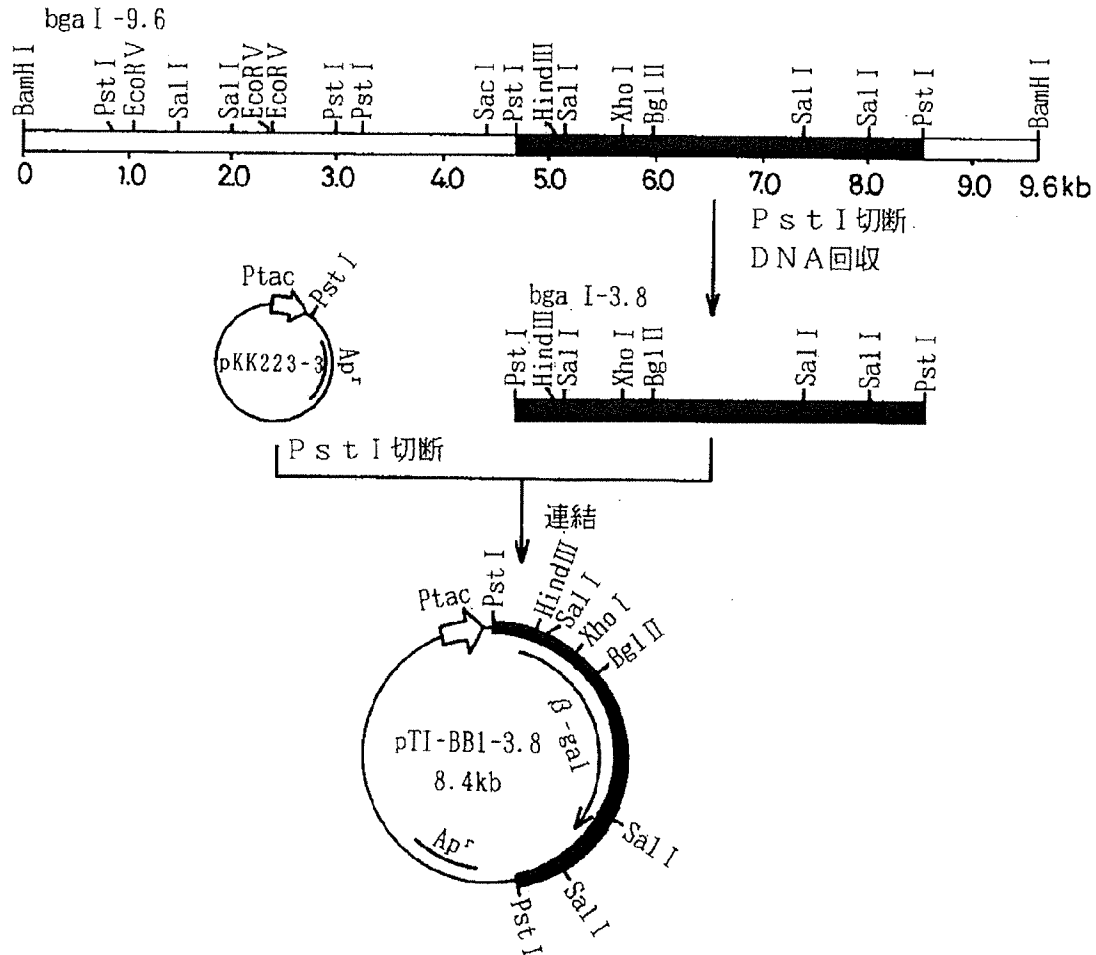


【図2】

bgaII-4.9



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 N 9/38

C 1 2 R 1:19)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所